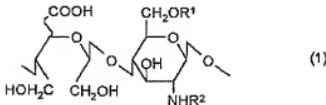


## GROWTH FACTOR ACTIVITY ENHANCER

## Abstract:

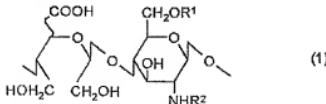
PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a medicine having low anticoagulant activity and excellent in growth factor activity enhancing effect.

SOLUTION: This growth factor activity enhancer is obtained by using a glycosaminoglycan derivative represented by the formula (1) having a recurring structure of a disaccharide of hexosamine with hexuronic acid as the basic skeleton, wherein the 2-positioned C and the 3-positioned C of the composing monosaccharide i.e., the hexuronic acid are cleaved and a part of or the whole of the uncleaved 2-positioned C are not substituted with sulfate group. (wherein, R1 is H or SO<sub>3</sub>H; and R2 is COCH<sub>3</sub> or SO<sub>3</sub>H.).



## CLAIMS

1. A growth factor enhancement agent comprising a glycosaminoglycan derivative or salt thereof as an active ingredient, the glycosaminoglycan derivative has the weight average molecular weight of 4,000 - 20,000 Da and has at least one structural portion expressed with a general formula (1) per one molecule of a glycosaminoglycan having a basic skeleton composed of repeated structure of hexosamine and hexuronic acid.



(R<sup>1</sup> is H or SO<sub>3</sub>H and R<sup>2</sup> shows COCH<sub>3</sub> or SO<sub>3</sub>H.)

2. The growth factor enhancement agent according to claim 1, wherein a glycosaminoglycan derivative or its salt further has the characteristic of following (c).

(c) By disaccharide analysis which combined decomposition by a glycosaminoglycan degradation enzyme, and analysis by high performance

chromatography, mol % of 2-deoxy 2-sulfamino-4-O-(4-deoxy 2-O-sulfo-alpha-L-Threo-hex-4-eno pyranosyl uronic acid)-6-O-sulfo-D-glucose is 0 to 10%, mol % of 2-deoxy-2-sulfamino-4-O-(4-deoxy alpha-L-threo-hex-4-eno pyranosyl uronic acid)-6-O-sulfo-D-glucose is 95 to 70%, mol % of 2-deoxy 2-sulfamino-4-O-(4-deoxy alpha-L-threo-hex-4-eno pyranosyl uronic acid)-D-glucose is 5 to 20%.

3. Medicine which comprises as an active ingredient the growth factor activity enhancement agent according to claim 1 or 2.

4. A composition containing the enhancement agent according to claim 1 or 2 and a growth factor.

5. Medicine which comprises as an active ingredient the composition of claim 4.

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-265369

(P2002-265369A)

(43) 公開日 平成14年9月18日 (2002.9.18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	P I	チヤコト <sup>8</sup> (参考)
A 6 1 K	31/726	A 6 1 K	4 C 0 8 4
	31/727		4 C 0 8 6
	45/00		4 C 0 9 0
A 6 1 P	25/00	A 6 1 P	25/00
	43/00		43/00
	1 1 1		1 1 1
		審査請求 未請求 請求項の数 5 O.L. (全 7 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-62756(P2001-62756)

(22) 出願日 平成13年3月7日 (2001.3.7)

(71) 出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72) 発明者 白井 靖剛

神奈川県横浜市金沢区金利谷東2-13-2  
-1007

(72) 発明者 濑山 眞子

埼玉県浦和市西堤4-8-10-502

(72) 発明者 菊谷 豊

神奈川県横浜市港北区綱島西2-3-2-  
009

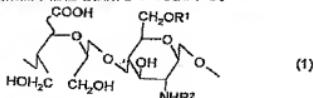
最終頁に続く

## (54) 【発明の名称】 増殖因子活性増強剤

## (57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗血凝凝固活性が低く、優れた増殖因子活性促進効果を有する薬剤の提供。

【解決手段】 ヘキソサミンとヘキスロン酸の二糖の構造を基本骨格として有し、部分的にその構成单糖であるヘキスロン酸の2位と3位の炭素原子間が開裂しており、更に開裂していないヘキスロン酸の2位の水酸基の一一部又は全部が硫酸基で置換されていないグリコサミノグリカン誘導体〔下記式(1)〕を有効成分として増殖因子活性増強剤として使用する。

(但し、R<sup>1</sup> は H 又は SO<sub>3</sub>H であり、R<sup>2</sup> は COCH<sub>3</sub> 又は SO<sub>3</sub>H を示す。)

【整理番号】 J200003600

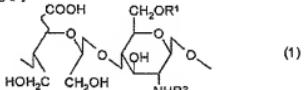
## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)の特性を有し、且つ(b)に記載の一般式(1)で表される構造部分を、ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格を有するグリコサミノグリカンの1分子あたりに1個以上有することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩を有効成分として含む増殖因子活性増強剤。

(a) 重量平均分子量が4,000~20,000 Da(ダルトン)であること。

(b) 一般式(1)

【化1】



(但し、R<sup>1</sup>はII又はSO<sub>3</sub><sup>2-</sup>であり、R<sup>2</sup>はCOCl<sub>2</sub>又はSO<sub>3</sub><sup>2-</sup>を示す。)

【請求項2】 グリコサミノグリカン誘導体又はその塩が更に下記(c)の特性を有することを特徴とする、請求項1記載の増殖因子増強剤。

(c) グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる二糖体組成において2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-スルボ-α-L-Threo-hex-4-エノピラノシリルウロコン酸)-6-O-スルボ-D-グルコースのモル%が5~10%、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシリルウロコン酸)-6-O-スルボ-D-グルコースのモル%が95~70%であり、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-α-L-threo-hex-4-エノピラノシリルウロコン酸)-D-グルコースのモル%が5~20%であること。

【請求項3】 請求項1又は2記載の増殖因子活性増強剤を有効成分とする医薬。

【請求項4】 請求項1又は2記載の増強剤と増殖因子とを含む組成物。

【請求項5】 請求項4の組成物を有効成分とする医薬。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、グリコサミノグリカンの誘導体を有効成分とする増殖因子活性増強剤及び該増強剤と増殖因子とを含む組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 ウロコン酸基とグルコサミン残基の繰り返し構造を基本骨格とする硫酸基を有するグリコサミノグリカンの一種であるヘパリンは、様々な増殖因子と親和性を有することが知られている (J. Biol. Chem., 26

8(32), 23898-23905 (1993) 等)。

【0003】 一方、ヘパリンは血中のアンチトロンビンIIIと結合し、血液凝固を阻害する活性が知られており、この活性はヘパリンを抗凝固剤として使用する場合以外はヘパリンを含む医薬品の重大な副作用の要因となる。従って、例えばヘパリンの有する増殖因子活性増強効果などを利用するために、上記副作用を低減させるための様々な試みがなされている (例えば特許平6-506685、特表平8-511764等)。

【0004】 ヘパリンを変更し、抗凝固活性を低下させた種々のグリコサミノグリカン誘導体がこれまでに得られている。例えば特開平11-310602に記載された過ヨウ素酸化還元2脱硫酸化ヘパリン (PO2DSH) もそのような誘導体の一つであり、神経細胞に対して神経突起伸長活性を有していることが知られている。しかし、当該物質が増殖因子の活性を増強することは知られていない。

【0005】 一方、神経の損傷時に神経成長因子 (NGF) を投与すると、神経の再生を促進するが、NGFは痛覚過敏を引き起こすことが知られている (医学のあゆみ, 195(9), 585-599 (2000))。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 神経損傷の治療においてNGFの投与量を減らし、疼痛の惹起等の副作用を極力低減せることなど、増殖因子の活性を増強することで副作用を低減する手段の開発に対する要請が高まっている。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者は上記課題に鑑み、グリコサミノグリカン誘導体であるPO2DSHがNGFの活性を増強することを見い出し、更に当該グリコサミノグリカン誘導体が他の増殖因子、特に神経芽細胞増殖因子 (NGF) に対しても同様にその活性を増強する作用を有することを見い出して本発明を完成了。

【0008】 すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

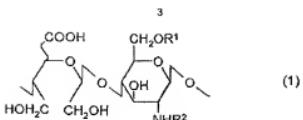
(1) 以下の(a)の特性を有し、且つ(b)に記載の一般式(1)で表される構造部分を、ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格を有するグリコサミノグリカンの1分子あたりに1個以上有することを特徴とするグリコサミノグリカン誘導体又はその塩を有効成分として含む増殖因子活性増強剤。

【0009】 (a) 重量平均分子量が4,000~20,000 Da(ダルトン)であること。

【0010】 (b) 一般式(1)

【0011】

【化2】



【0012】(但し、R<sup>1</sup>はR又はSO<sub>3</sub>Hであり、R<sup>2</sup>はCOCH<sub>3</sub>、YはSO<sub>3</sub>Hを意味。)

【0013】(2) グリコサミノグリカン誘導体又はその塩が更に下記(c)の特性を有することを特徴とする。(1) 記載の増殖因子抑制剤

(c) グリコサミノグリカン分解酵素による分解と高速液体クロマトグラフィーによる分析を組み合わせた二糖分析により得られる二糖体組成において2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ-2-スルホ- $\alpha$ -L-threo-hex-4- $\alpha$ -ノビラノシリルウロニ酸)-D-グルコースのモル比が0~10%、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-(4-デオキシ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノビラノシリルウロニ酸)-D-スルホ- $\beta$ -グルコースのモル比が95~70%であり、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-0-(4-デオキシ- $\alpha$ -L-threo-hex-4- $\alpha$ -ノビラノシリルウロニ酸)-D-グルコースのモル比が5~20%である。

【0014】(3) (1) 又は (2) 記載の増殖因子活性増強剤を有効成分とする医薬。

【0015】(4) (1) 又は (2) 記載の増強剤と増強因子とを含む組成物。

【0016】(5)(4)記載の組成物を有効成分とする医薬。

[0017]

【発明の実施の形態】以下、発明の実施の形態によります。本発明を詳説する。本発明の増強剤前記(a)の性質を有し、且つ(b)に記載の一般式(1)で表される構造を、ヘキサンミンとヘキソノン酸の繰り返し構造で構成される基本骨格1分子あたりに1以上有することを特徴とするクリソミナリゴカルボン酸類又はその塩(以下「本実施形態(A)」と有する成分)とて含有する。

〔0018〕本発明誘導体は、上記一般式(1)の構造部分をヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し構造で形成される基本骨格を有するグリコサミノグリカンの1分子あたりに1個以上有するオリゴ糖又は多糖である。ここで、「ヘキソサミン」とは、ヘキソース(六炭糖)の2位炭素原子にアミノ基、アセチルアミノ基又はスルホアミノ基を有し、6位ヒドロキシル基が硫酸化されることもある単糖を指称し、「ヘキスロン酸」とは、ヘキソースの6位炭素原子がカルボキシル基を形成し、2又は3位ヒドロキシル基が硫酸化されていることもありまする单糖を指称する。

【0019】尚、「グリコサミノグリカン」とは、上記ヘキソサミンとヘキスロン酸の繰り返し単位で形成される構造を基本骨格とするオリゴ糖又は多糖を指称する。本明細書において「硫酸基を有するグリコサミノグリカ

ン」とは、特に上記グリコサミノグリカンのうち、硫酸基を有するヘキソサミン又はヘキソスルホ酸を構成単糖として1以上有するグリコサミノグリカンを指称する。

【0020】本発明説明書は重量平均分子量5,500~25,000程度の、ヘパリン又はヘパラン硫酸などの硫酸基を有するグリコサミノグリカンを原料として用いて特開平11-310602に記載された方法に従って過ヨウ素酸液化還元及びヘキサン硫酸基の位阻硫酸基の脱硫酸化反応を行ふ。

【0021】本発明誘導体の重量平均分子量は試験法2に記載の分子量測定法による測定値が4,000-20,000-

に記載の二糖体分析法によれば分子量が約1,000~20,000である。この重均分子量は実験例の試験法2に記載の分子量測定法による測定値から算出される値である。

【0022】また、本発明酵母導体は上記（c）に記載した二糖体組成と特性として有していることが好ましい。

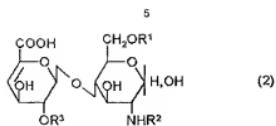
ここで、本発明酵母導体における上記（a）の二糖体組成は、後述する実験例の試験法1に記載の二糖分析法による測定値から算出するものであつる。

【0023】上記(c)に規定する二糖体組成は、試験法1に記載の二糖分析法により検定が可能な下記一般式

(2) で示される不飽和二糖の総量(2-アセトミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ- $\alpha$ -L-threo-hex-エノピラノシリウロン酸)-D-グルコース(以下△DHS-USと記載する)、2-アセトミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノピラノシリウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース(以下△DHS-6Sと記載する)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノピラノシリウロン酸)-D-グルコース(以下△DHS-NSと記載する)、2-アセトミド-2-デオキシ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノピラノシリウロン酸)-D-グルコース(以下△DHS-d1(6,6)S)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノピラノシリウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース(以下△DHS-d1(6,6)Sと記載する)、2-アセトミド-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノピラノシリウロン酸)-D-グルコース(以下△DHS-d1(1,6)Sと記載する)、2-デオキシ-2-スルファミノ-4-O-(4-デオキシ-2-O-スルホ- $\alpha$ -L-threo-hex-4-エノピラノシリウロン酸)-6-O-スルホ-D-グルコース(以下△DHS-tri(1,6,6)Sと記載する)のモル%の合計]を100%として、上記(4)に記載した各不飽和二糖(△DHS-tri(1,6,6)S、△DHS-d1(6,6)S、及び△DHS-NS)の割合を示したものであり、当該数値は酵素消化前のグリコサミノグリカン誘導体の硫酸基の位置及び数を反映するものである。

[0034]

50 【化 3】



[0025]

【表1】

不飽和二酸	標準式の置換基
A DHIS-9S	H      COCH <sub>3</sub> H
A DHIS-6S	SO <sub>3</sub> H      COCH <sub>3</sub> H
A DHIS-N5	H      SO <sub>3</sub> H      H
A DHIS-US	H      COCH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H
A DHIS-J(6,N6)	SO <sub>3</sub> H      SO <sub>3</sub> H      H
A DHIS-h(U,6S)	H      SO <sub>3</sub> H      SO <sub>3</sub> H
A DHIS-tri(U,6,N)	SO <sub>3</sub> H      OOCCH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H
A DHIS-tri(U,6,N,S)	SO <sub>3</sub> H      SO <sub>3</sub> H      SO <sub>3</sub> H

【0026】また、上記略号の示す構造は以下の通り表記されることもある。 $\Delta$ HS-OS :  $\Delta$ lexA1- $\rightarrow$ GlcNAc、 $\Delta$ DIIS-OS :  $\Delta$ lexA1- $\rightarrow$ GlcNAc(6S)、 $\Delta$ DIIS-NS :  $\Delta$ lexA1- $\rightarrow$ GlcNAc、 $\Delta$ DIIS-S :  $\Delta$ lexA(2S)- $\rightarrow$ GlcNAc、 $\Delta$ DIIS-di(6,N)S :  $\Delta$ lexA1- $\rightarrow$ GlcNAc(6S)、 $\Delta$ DIIS-di(1,U,N)S :  $\Delta$ lexA(2S)1- $\rightarrow$ GlcNAc、 $\Delta$ DIIS-di(1,U,6)S :  $\Delta$ lexA(2S)1- $\rightarrow$ GlcNAc(6S)、 $\Delta$ DIIS-tri(1,U,6,N)S :  $\Delta$ lexA(2S)1- $\rightarrow$ GlcNAc(6S)。

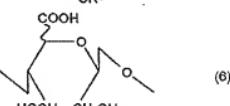
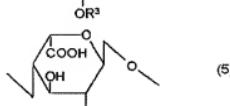
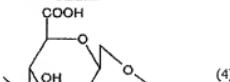
【0027】上記式中、 $\Delta$ hexAは不飽和ヘキソロン酸、GlcNAcはN-アセチルグルコサミン、GlcNSはN-硫酸化グルコサミン、カッコ内は糖酸基の結合位置を示す。

（2）上記二種分析法において生成する一般式（3）の構造を有する不飽和二糖は、分析対象となる本発明誘導体の基本骨格を構成する下記一般式（4）又は（5）のヘプタン-4-オキ酸残基と一般式（7）のヘキソシミン残基が結合した一般式（3）中の（A）-（B）の構造により生ずる。また本発明誘導体は下記の一般式（3）

【0029】  
【化4】  
OH- - (A) - (B) - n-II (3)  
但し、(A) は下記一般式(4)で示されるグルクロン酸残基、下記一般式(5)で示されるイズロン酸残基、又は下記一般式(6)で示される開裂されたヘキスロン酸残基であり、

【化5】

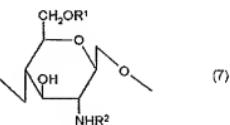
6



【0031】(B) は下記一般式(7)で示されるヘキ

[0033]

[化6]



【0033】但し、一般式(4)～(7)において $R^1$ 及び $R^2$ はそれぞれ独立に又は $S_0H$ であり、 $R^2$ はそれぞれ独立に $COC_2H$ 又は $S_0H$ を示す。また一般式(7)のヘキソサミン残基においては、 $R^1$ 及び $R^2$ の少なくとも一方が $S_0H$ を示される。

【0034】また一般式(3)において  $n$  は  $4 \leq n \leq 50$  を充たす整数であり、(A) の少なくとも一つは一般式(6)の残基である。

(6) の疾患である。

【0035】前記へキソサミンとしてはグルコサミン、ガラクトサミン、マンノサミンなどが例示されるが、D-グルコサミンが好ましい。ヘキソサミンはアミノ基又は

れている、すなわちN-硫酸化及び/又は6-O-硫酸化されていることが好ましいが、硫酸基を有しないヘキソサミンであってもよい。ヘキソロン酸としてはD-グルコロン酸及びL-イズロロン酸が挙げられる。ヘキソロン酸の一部はその2位と3位の炭素原子間で開裂し、その開裂部位は還元されており、開裂していないヘキソロン酸は、その2位のヒドロキシル基の一部又は全部が硫酸基で置換されていないことが好ましい。そして基本骨格中の繰り返し単位の中に上記開裂されたヘキソロン酸とヘキソサミンとが結合した前記一般式(1)で表される構造単位が本発明誘導体1分子あたり1以上存在する。

【0036】本発明増強剤はヒトを含むほ乳類の医薬として使用することが可能である。本発明増強剤に含まれる上述の本発明誘導体は、ヘパリン骨格を有する多糖が抱える削削作用、すなわち抗血液凝固性が低減されたものである。本発明誘導体は、例えば最終濃度が $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ で標準血漿に添加して後述の実施例中測定法3記載の方法に従ってAPTTを測定した際に、活性化トロンボプラスチン時間(APTT)が70秒未満、より好ましくは60秒未満、もっとも好ましくは50秒以下である。尚、上記標準血漿とは健常ラット10匹の下大動脈より3.2%クエン酸1/10容積で血液を採取し、その血液を1,000×gで10分間に遠心分離して得られた血漿を同量ずつ混合したものと定義される。

【0037】本発明誘導体は増殖因子の活性を増強する作用を有する。従って、本発明増強剤によって活性が増強される増殖因子は本発明誘導体の共存下、好ましくは生理的条件下においてその活性が増強される増殖因子であればいずれであってもよい。そのような増殖因子としては例えばヒト男性ホルモン誘導性増殖因子(AIGF)、トランシスフォーミング成長因子(TGF)、インスリン様成長因子(IGF)、上皮細胞成長因子(EGF)、毛様体神経成長因子(CNTF)、FGF(酸性纖維芽細胞増殖因子(aFGF)、塩基性纖維芽細胞増殖因子(bFGF))、血小板由来増殖因子(PDGf)、脳由来成長因子(RNDF)、NGF、肝細胞増殖因子(HCF)、肝実質細胞増殖因子、血管内皮細胞成長因子(VEGF)、血管内皮細胞増殖因子(ECGF)、骨細胞増殖因子(CSF)、ミッドカイン(MK)、インターフェロンγ(IFN-γ)、角質細胞成長因子(KG F)、CXCKモカイン、インターロイキン8(IL-8)、ビトロネキチジン(VN)、ヘパリン結合性脳細胞分裂誘導因子(HBEM)、及びヘパリン結合性神経突起伸長促進因子(HBNF)等が例示されるが、その中でも特にbFGF&NGFが好ましい。

### 【0038】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。

#### 試験法1

【酵素による二重分析】本発明誘導体及び標準ヘパリンの硫酸基の位置の分析は、次のようにして行った。すな

わち、これらの被検物質を酵素消化し、生成した不飽和二糖(前記一般式(2))を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した(「生化学実験講座3、糖質」1(東京化学同人刊、1991) p.49-62に記載の「2・8グリコサミノグリカン分解酵素とHPLCを組み合わせた構造解析」参照)。各不飽和二糖のピーク面積を計算し、全面積に対するピーク面積を百分率で表示した。

#### 【0039】(1) 酵素による消化

生化学実験講座3、糖質1 p.49-62に記載の方法により消化酵素で分解した。標準ヘパリン及び本発明誘導体各1.0mgを2mM酢酸カルシウムを含む20mM酢酸ナトリウム(pH7.0)220μlに溶解して、20mlのヘパリナーゼ、20mLのヘパリナーゼI及びIIを加えて、37°Cで2時間反応させた。

#### 【0040】(2) HPLCによる分析

標準ヘパリン又は本発明誘導体の酵素による消化後の溶液50μlを、HPLC(理化化、モデル852型)を用いて分析した。イオン交換カラム(Dionex社、CarboPak PA-1 φ4.0mm×250mm)を使用し、232nmでの吸光度を測定した。不飽和二糖スキャンダード(生化学工業株式会社製)を基準とし(Yamada, et al., J. Biol. Chem., 270, 86 96-8706(1995))、流速1ml/分で、塩化リチウムを用いたグラジェント系(50mM→2.5mM)を用いる方法で準備した(YARIYA, et al., Comp. Biochem. Physiol. 103B, 473-479, (1992))。

#### 【0041】試験法2

【分子量測定】標準ヘパリン又は本発明誘導体の1%溶液5μlをHPLCによるグルコン酸で分析した。カラムはTSKgel-G(4000+G3000+C2500)PBM(東ソー、φ7.8mm×30cm)を用い、0.2M塩化ナトリウムで、40°C、0.6ml/分の流速で展開した。検出には示差屈折計(島津製作所、AI-D-2A)を用いた。表1における重量平均分子量はヘパリンの分子量標準品を対照として求めた(Kaneda et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 220, 108-112(1996))。

#### 【0042】試験法3

【APTT及びTTの測定】APTTの測定のため、10匹のラットの下大動脈より3.2%クエン酸1/10容積で採取し、血液を1,000×g、10分間遠心分離して得た血漿を混合した標準血漿100μlと様々な濃度の被検物質100μlとを測定用カップに入れ、37°Cで1分間保温した。その後、予め37°Cに保温しておいたアクトシン(商品名:ウェルファイド株式会社)100μlを添加し、更に1分間保温した。次いで、37°Cに保温しておいた0.02M $\text{CaCl}_2$ 溶液100μlを添加し、この時より凝固が起こるまでの時間を血液凝固自動測定装置(KC-10A:アメルング社製)で測定した。また、APTTが100秒となる本発明誘導体の濃度を算出し、標準ヘパリンの前記濃度を本発明誘導体の前記濃度を基準として百分率で算出し、この数値(%)を本発明誘導体のAPTT活性とした。

【0043】TTの測定のため、上記標準血漿100μlと様々な濃度の被検物質100μlとを測定法カップに入れ、37℃で1分間保温した。その後、37℃に保温したトロンビン(100U/ml)100μlを添加し、この時より凝固が起るまでの時間を上記血液凝固自動測定装置で測定した。本発明誘導体及び標準ヘパリンのTTが100秒となる標準血漿中の最終濃度を求め、標準ヘパリンの前記濃度を本発明誘導体の前記濃度を基準として百分率で算出し、この数値(%)を本発明誘導体の活性とした。

#### 【0044】[本明細書における標準ヘパリン]

以下に示す物性のヘパリンを標準ヘパリンとした。

(1) 上記試験法1に記載の二段階分析による測定値から算出した標準ヘパリンの二糖体組成は表1に記載の通り、△DiHS-OS : 4.1%、△DiHS-NS : 3.4%、△DiHS-6S : 3.7%、△DiHS-US : 2.6%、△DiHS-di(U, N)S : 12.7%、△DiHS-di(U, N)S : 7.6%、△DiHS-di(U, S) : 1.7%、△DiHS-tri(U, S, N)S : 64.2%である。

(2) 抗血液凝固活性が160IU/ngである。

(3) 重量平均分子量が11,000～14,000Daである。

#### 【0045】調製例

1：標準ヘパリンの過ヨウ素酸化・還元によるヘキサン酸の部分開裂処理標準ヘパリン(重量平均分子量：13,700Da) Syntex社製Lot. No.40210910 : ベーリンナトリウム塩) 1.3gを、過ヨウ素酸ナトリウムの存在下で酸化した。すなわちこの酸化反応は、50mMの0.05Mの過ヨウ素酸ナトリウム、50mMの酢酸ナトリウムを含んだpH5.0の溶液中で、標準ヘパリンを4℃、3日間酸化処理して行った。酸化処理後、過剰の過ヨウ素酸を最終濃度250m

Mのグリセリンを加えることで還元して分解し、蒸留水に対して2日間透析し、その後凍結乾燥することにより1.2gの過ヨウ素酸化ヘパリンを得た。この過ヨウ素酸化ヘパリンの生成時に生じたアルデヒド基を、30mMの0.2M水素化ホウ素ナトリウム、0.25M炭酸水素ナトリウムを含んだpH9.0の上記酸化ヘパリン1.2gを含む溶液を4℃、3時間反応させることでこの過ヨウ素酸化ヘパリンのアルデヒド基を還元した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムは、氷酢酸で反応液のpHを5.0に調節し、30分間室温で放置することで分解し、再び5Mの水酸化ナトリウムでpH9.0に調節し、蒸留水に対して2日間透析し、その後凍結乾燥することにより、1.1gの過ヨウ素酸化ヘパリンのナトリウム塩を得た。

#### 【0046】2：過ヨウ素酸化還元ヘパリンの2-O-脱硫酸化

上記1で得た1.1gの過ヨウ素酸化還元ヘパリンのナトリウム塩を、20mMの0.05Mの水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、室温にて20分間放置した。この溶液を凍結乾燥して選択的に2位の硫酸基を脱硫酸化した。このようにして得られた凍結乾燥ペーパーを10mLの1倍水酸化ナトリウム水溶液で溶解し、20%酢酸溶液でpH9.0に調節し、30分間室温に放置した。その後、蒸留水に対して2日間透析し、再び凍結乾燥して、脱硫酸化された過ヨウ素酸化還元ヘパリン(P02DSI; 本発明誘導体)のナトリウム塩0.8gを得た。上記試験法1に従い、酵素消化による二重分析を行った結果を表1に示した。

#### 【0047】

#### 【表2】表1

△DiHS	OS	NS	6S	US	(E,N)S	(U,N)S	(U,S)S	(U,S,N)S
標準ヘパリン	4.1	3.4	3.7	9.6	19.7	7.6	1.7	64.2
P02DSI	0.0	11.9	0.0	0.0	34.2	0.0	0.0	3.9

【0048】また上記試験法2に従い、HPLCによりP02DSIの重量平均分子量を測定し、その結果を表2に示した。

#### 【0049】

#### 【表3】表2

	重量平均分子量(MW)
標準ヘパリン	18,700
P02DSI	11,100

#### 【0050】実施例1

神経成長因子(NGF)活性の増強活性測定

被検物質としては調製例で得られたP02DSI及び標準ヘパリン(対照)を用いた。神経細胞株PC12D細胞(愛知県立病院)コロニー大平敬彦博士より恵与)2×10<sup>4</sup>個を10%牛胎児血清を含む2mlのグルバッコのDMEM培養液(以下単に「DHEM」と略記する)中に24時間、CO<sub>2</sub>インキュベータ(0.5%CO<sub>2</sub>/Air)を使用して培養した。

【0051】培養にはあらかじめ0.1ng/mlのボリリジン水溶液でコーティング処理した24mmコニングデンディッシュを用いた。使用前にディッシュを水とDHEMで各々2

回ずつ洗浄した。洗浄後、ディッシュを無血DHEM培地(1,10,50mg/mlでNGF、0.01,0.1,1.0,10,100μg/mlで被検物質を含む)に置換して更に72時間培養した。その後、1mlの2%グルタルアルデヒドを含むリン酸緩衝生理的食塚液(以下「PBS」とも記載する)に置換して、室温で2時間ディッシュ上で細胞を固定した。固定後、1mlの1%マーシーブリリアントブルー/50%メタノール・PBSに置換して、2時間ディッシュ上の細胞を染色した。染色後、2mlの5%メタノール/PBSに置換して、30分間脱色した。脱色液を廃棄した後に、ディッシュを緩やかな流水で更に脱色した。ディッシュを風乾し、神経突起伸長の様子を観察した。

【0052】NGF無添加、1ng/ml、10ng/ml、及び50ng/mlのNGFを添加して培養した際の神経突起伸長の程度と比較して、被検物質と1ng/mlのNGFを添加した際の神経突起伸長活性の活性化的程度を観察した(表3)。また、被検物質を添加しない群を陰性対照群とした。その結果、P02DSIを使用した場合は1ng/mlのNGF濃度であるにもかかわらず、50ng/mlのNGFを添加した際と同程度の神

経突起伸長が起こっていることが判明し、このことから、PO2DSHはNGFの活性を大幅に増強する優れた活性を有していることが明らかとなった。

被検物質最終濃度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	NOP(最終濃度 $1\text{ng}/\text{ml}$ )				
	0.01	0.1	1	10	100
標準ヘパリン	-	-	-	-	-
PO2DSH	-	±	++	+	±

++ : 50ng/mlのNGFを添加した場合と同程度の活性

+: 10ng/mlのICPを添加した場合と同程度の活性

±: 階性対照よりは活性を有するが、10ng/mlのNGFを添加した場合には及ばない程度の活性

-: 階性対照と同程度の活性

#### 【0054】実施例2

塩基性線維芽細胞増殖因子(bPGF)活性の増強活性測定  
実施例1と同じ被検物質を用いた。サブコンフルエンントの線維芽細胞株A31細胞 (BALB/c3T3; clone A31) を0.2%トリプシン/0.05EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 水溶液で剥がし、10%牛胎児血清を含むRPMI1640 (JWAK1社製) 培地で遠心洗浄した後、0.2%牛胎児血清を含むBasa 1 ME/S-MEM (GIBCO社製)  $\times 10^6$ 個/mlに調整し、96穴マルチプレートに $100\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ播種した。Basal 1 ME/S-MEM培地で $1.2\text{ng}/\text{ml}$ 、 $12\text{ng}/\text{ml}$ 、 $40\text{ng}/\text{ml}$ 又は $120\text{ng}/\text{ml}$ に調整したbPGFを $50\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加した。各濃度のbPGFを添加したwellにつき、Basal ME/S-MEM培地で調製した被検物質を $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $400\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整した場合と同程度の活性

#### 【0053】

##### 【表4】表3

mlに調整したBasal ME/S-MEM培地を $50\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した(最終濃度 bPGF: 0.3ng/ml、1ng/ml、3ng/ml、10ng/ml、30ng/ml)。被検物質:  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 。この96穴マルチプレートを $37^\circ\text{C}$ で3日間、 $5\% \text{CO}_2$ イシキューベーク内に培養した。培養後、Cell Counting 液液 (DOJINDO社製) を $20\mu\text{l}$ 添加して更に3時間培養後、450nmの吸光度を測定した。

【0055】その結果、被検物質を添加しなかった对照群(陰性対照群)はbPGFの濃度に依存して細胞増殖活性を示しました。一方、被検物質としてPO2DSHを使用した群ではbPGFの活性を1.2~1.5倍程度促進することが観察された。この活性は標準ヘパリンを添加した階性対照群と同等であった。

#### 【0056】

【発明の効果】本発明により、抗血液凝固活性が低く、優れた増殖因子活性の増強剤が提供され、増殖因子による副作用の低減を図ることができる。

#### フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

ナ-マコ-ト' (参考)

// C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z

I フーム(参考) 4C084 AA17 BB52 MA02 MA14 ZA022  
ZC022  
4C086 AA01 AA02 BA26 MA02 MA04  
MA14 ZA02 ZC02  
4C090 AA02 BA02 BB22 BB24 BB33  
BB36 BB55 CA21 CA34 DA23